

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000532

International filing date: 25 February 2005 (25.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR  
Number: 10-2004-0013032  
Filing date: 26 February 2004 (26.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 17 May 2005 (17.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



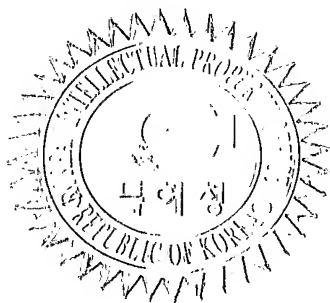
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2004-0013032  
Application Number

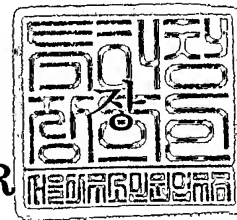
출원 년 월 일 : 2004년 02월 26일  
Date of Application FEB 26, 2004

출원인 : 씨제이 주식회사  
Applicant(s) CJ Corp.



2005 년 03 월 31 일

특 허 청  
COMMISSIONER



## 【저지사항】

**【서류명】** 특허출원서  
**【권리구분】** 특허  
**【수신처】** 특허청장  
**【제출일자】** 2004.02.26  
**【발명의 국문명칭】** 뉴로스포라 크라사 기원의 감마부티로베타인 하이드록실라제  
**【발명의 영문명칭】**  $\gamma$ -Butyrobetaine hydroxylase originated from Neurospora crassa  
**【출원인】**  
**【명칭】** 씨제이 주식회사  
**【출원인코드】** 1-1998-003466-9  
**【대리인】**  
**【성명】** 손민  
**【대리인코드】** 9-1999-000420-6  
**【포괄위임등록번호】** 2002-028278-6  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 정성오  
**【성명의 영문표기】** CHUNG, SUNG OH  
**【주민등록번호】** 611004-1023612  
**【우편번호】** 463-749  
**【주소】** 경기도 성남시 분당구 분당동 셋별 삼부 APT 402동 405호  
**【국적】** KR  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 이병욱  
**【성명의 영문표기】** LEE, Bheong-Uk  
**【주민등록번호】** 600415-1064011  
**【우편번호】** 606-080

**【주소】** 부산광역시 영도구 동삼동 149-1번지 고신대학교 생명과학  
 부  
**【국적】** KR  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 강환구  
**【성명의 영문표기】** KANG,Whan-Koo  
**【주민등록번호】** 590226-1030123  
**【우편번호】** 305-390  
**【주소】** 대전광역시 유성구 전민동 엑스포 Apt. 210동 1503호  
**【국적】** KR  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 주재영  
**【성명의 영문표기】** JU,Jae Yeong  
**【주민등록번호】** 690423-1822811  
**【우편번호】** 463-500  
**【주소】** 경기도 성남시 분당구 구미동(무지개마을) 대림아파트 104  
 동 401호  
**【국적】** KR  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 고은성  
**【성명의 영문표기】** KOH,Eun Sung  
**【주민등록번호】** 761101-2221218  
**【우편번호】** 442-380  
**【주소】** 경기도 수원시 팔달구 원천동 양천연립 302호  
**【국적】** KR  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 박성식

**【성명의 영문표기】** PARK, Sung-Sik  
**【주민등록번호】** 720110-1058233  
**【우편번호】** 135-230  
**【주소】** 서울특별시 강남구 일원동 목련타운 101-701  
**【국적】** KR  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 박영훈  
**【성명의 영문표기】** PARK, Young Hoon  
**【주민등록번호】** 511229-1010425  
**【우편번호】** 463-500  
**【주소】** 경기도 성남시 분당구 구미동 무지개 대림Apt. 111동 102호  
**【국적】** KR  
**【심사청구】** 청구  
**【미생물기탁】**  
**【기탁기관명】** KCCM  
**【수탁번호】** 10557  
**【수탁일자】** 2004.01.27  
**【핵산염기 및 아미노산 서열목록】**  
**【서열개수】** 4  
**【서열목록의 전자문서】** 첨부  
**【취지】** 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인  
손민 (인)  
**【수수료】**  
**【기본출원료】** 26 면 38,000 원  
**【가산출원료】** 0 면 0 원  
**【우선권주장료】** 0 건 0 원

【심사청구료】	7	항	333,000	원
【합계】			371,000	원
【첨부서류】			1.미생물기탁증명서[국제양식포함]_1통	

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*) 기원의 감마부티로베타인 하이드록실라제 ( $\gamma$ -Butyrobetaine hydroxylase:  $\gamma$ -BBH)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기한 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체, 상기한 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 감마부티로베타인 하이드록실라제, 및 감마부티로베타인을 상기한 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 감마부티로베타인 하이드록실라제로 하이드록실화하여 L-카르니틴(L-Carnitine)을 제조하는 방법에 관한 것이다.

**【대표도】**

도 1

**【색인어】**

뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*), 감마부티로베타인 하이드록실라제 ( $\gamma$ -Butyrobetaine hydroxylase:  $\gamma$ -BBH), L-카르니틴(L-Carnitine)

## 【명세서】

### 【발명의 명칭】

뉴로스포라 크라사 기원의 감마부티로베타인 하이드록실라제{  $\gamma$ -Butyrobetaine hydroxylase originated from *Neurospora crassa*}

### 【도면의 간단한 설명】

- <1>           도 1은 감마부티로베타인 하이드록실라제( $\gamma$ -Butyrobetaine hydroxylase:  $\gamma$ -BBH)를 포함하지 않는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*: *E. coli*)와 감마부티로베타인 하이드록실라제를 포함하는 에스케리키아 콜라이를 IPTG(Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)로 발현 유도한 후 균체를 파쇄하고 상등액을 SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분석한 도이다.
- <2>           도 2은 증폭되어진 감마부티로베타인 하이드록실라제 cDNA 유전자를 pT7-7에 클로닝한 후 이를 0.8 % 아가로스 겔 상에서 분석한 도이다.
- <3>           도 3는 뉴로스포라 유래의 감마부티로베타인 하이드록실라제와 인간, 쥐, 슈도모나스로부터 분리되어진 감마부티로베타인 하이드록실라제의 핵산 염기서열 비교를 나타내는 도이다.
- <4>           도 4는 플라스미드 pT7-BBH2의 구성도를 나타내는 도이다.
- <5>           도 5은 감마부티로베타인으로부터 L-카르니틴을 생산하는 기작을 나타내는 도이다.
- <6>           도 6은 NCBI BLAST의 검색엔진을 이용한 감마부티로베타인 하이드록실라제



유전자를 검색한 결과를 나타낸 도이다.

### 【발명의 상세한 설명】

### 【발명의 목적】

### 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<7> 본 발명은 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*) 기원의 감마부티로베타인 하이드록실라제 ( $\gamma$ -Butyrobetaine hydroxylase:  $\gamma$ -BBH)에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 뉴로스포라 크라사 기원의 감마부티로베타인 하이드록실라제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기한 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체, 상기한 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 감마부티로베타인 하이드록실라제, 및 감마부티로베타인을 상기한 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 감마부티로베타인 하이드록실라제로 하이드록실화하여 L-카르니틴(L-Canitine)을 제조하는 방법에 관한 것이다.

<8> 비타민 B12로 알려진 L-카르니틴(3-하이드록시-4-트리메틸아미노 부티레이트)은 1905년에 최초로 러시아의 과학자 Gulewitsch 및 Krimberg에 의해 소의 근육 조직으로부터 분리되었으며, 그 화학구조가 1932년에 확인된, 인체대사에서 매우 중요한 천연의 비타민 유사물질이다. L-카르니틴은 통상 생체내에 존재하며 미토콘드리아 막을 통하여 활성화 긴사슬 유리 지방산의 운반체로서의 역할을 수행하게 된다. 미토콘드리아 막은 아실-CoA 유도체에 대해서는 불투과성이기 때문에 L-카르니틴과의 에스테르화 반응이 일어난 경우에 한하여 긴사슬의 유리 지방산을 통과

시킨다. 인체 내에 골격근, 간, 심장, 신장에서의 L-카르니틴의 수치가 낮을 경우 긴사슬 유리 지방산을 에너지원으로 이용하기 어렵게 하므로 성장장애, 심근병증, 근육약화 등 카르니틴 대사이상 질환에 걸릴 수 있다. 만약 체내에서 L-카르니틴이 적절한 양으로 합성되지 못할 경우, 결핍 증세를 피하기 위해 이를 식사에서 보충하여야 한다. 특히 L-카르니틴을 자체적으로 생합성하지 못하는 유아의 경우, L-카르니틴은 필수 영양 성분이다.

<9> L-카르니틴 제제는 약제 제품의 활성 성분으로 사용된다. 카르니틴 결핍 및 기타 치료학적 요법, 특히 심장질환등의 경우에는 L-카르니틴의 보충이 필요하다. 최근에 이러한 치료용으로써의 L-카르니틴의 사용이 중요한 것으로 알려지고 있다 (R.A. Frenkel and J.D. Mc Garry, "Carnitine biosynthesis, metabolism and functions", Academic Press, 1980).

<10> 생체내에서의 L-카르니틴의 작용은 매우 중요한 것으로 밝혀지고 있으나 이를 대량으로 획득하기에는 생물학적 추출법등이 적절치 못하다. 이를 손쉽게 획득할 수 있는 방법에는 광학적 이성질체를 포함하는 DL-카르니틴을 이용하는 방법이 존재한다. 이러한 방법은 D-카르니틴을 함유하고 있기 때문에 생체내에서의 작용시 부작용이 유발된다(Curr. Ther. Res. 28, 195-198, 1980). 많은 경우 D-카르니틴은 생체내에서 L-카르니틴과 경쟁적으로 작용하여 긴사슬 유리 지방산의 미토콘드리아내 베타산화를 방해하게 되며 이는 신장의 기능이 현저히 떨어진 환자의 경우 더욱 심각한 저해를 나타내는 것으로 알려져있다.

<11> 광학적으로 순수한 L-카르니틴을 획득하는 방법으로 화학적 광학분할방법(US

Patent No. 5,166,426), 미생물이나 효소를 이용한 생물학적인 방법(US Patent No. 5,187,093) 및 키랄 원료를 출발물질로 하여 L-카르니틴을 획득하는 방법(US Patent No. 6,420,599 B2) 등 다양한 방법이 시도되어지고 있다.

<12> L-카르니틴을 수득하기 위한 다양한 방법중 미생물이나 효소를 이용하는 생물학적 방법에서 감마부티로베타인으로부터 광학적으로 순수한 L-카르니틴을 획득하기 위하여 사용되어지는 효소가 감마부티로베타인 하이드록실라제이다. 이 효소는 쥐와 인간에서 분리되었으며(Rebouche and Engel, *J Biol Chem* 255:8700-8705, 1980) 이미 유전자 서열은 밝혀져 있다. 포유류 등의 고등생물체 내에서의 L-카르니틴의 생합성은 전구물질로 단백질의 일부인 라이신을 이용하는데 반하여 뉴로스포라 크라사는 유리 라이신으로부터 광학적으로 순수한 L-카르니틴을 생산할 수 있는것으로 알려져 있다(Fraenkel, *Biol Bull*, 104:359-371, 1953). 이에 관한 메커니즘을 살펴보면, S-아데노실메치오닌(S-adenosyl methionine)이 라이신에 메틸기 공여체로 작용하여  $\epsilon$ -N-트리메틸라이신( $\epsilon$ -N-trimethyllysine)을 합성하며 이는  $\beta$ -하이드록시-트리메틸라이신( $\beta$ -hydroxy-trimethyllysine)을 합성한다. 합성된  $\beta$ -하이드록시-트리메틸라이신은 트리메칠아미노부틸알데히드를 거쳐 감마부티로베타인이 합성된다.

<13> 상기한 바와 메커니즘을 통해 생성된 감마부티로베타인을 전구물질로 하여 L-카르니틴을 생산하는 뉴로스포라 크라사 기원의 감마부티로베타인 하이드록실라제의 유전자 서열이 밝혀진 바 없었으며, 이러한 뉴로스포라 크라사 기원의 감마부티로베타인 하이드록실라제는 매우 신규하다.

### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<14> 이러한 배경하에서, 본 발명자는 뉴로스포라 크라사 기원의 감마부티로베타인 하이드록실라제의 유전자를 새로이 밝혀내었으며 이러한 유전자를 이용하여 발현된 감마부티로베타인 하이드록실라제를 이용하여 감마부티로베타인으로부터 L-카르니틴을 생물학적 방법으로 생산할 수 있게 되었다.

### 【발명의 구성】

<15> 하나의 양태로서, 본 발명은 뉴로스포라 크라사 기원의 서열번호 1의 감마부티로베타인 하이드록실라제를 코딩하는 유전자를 제공한다.

<16> 본 발명자는 필라멘트상 진균인 뉴로스포라 크라사 기원의 감마부티로베타인 하이드록실라제의 유전자를 확보하기 위해서 이종 유래의 감마부티로베타인 하이드록실라제를 코딩하는 유전자들을 비교 분석하고 보존 영역을 확인한 후 이를 기초로 하여 데이터베이스에 등록된 뉴로스포라 크라사의 전체 유전자 서열과 비교하여 부분 일치율을 보이는 유전자들로부터 감마부티로베타인 하이드록실라제의 기능을 보이는 후보 유전자를 결정하고 이 유전자를 확보할 수 있는 프라이머를 합성하였다. 뉴로스포라 크라사로부터 cDNA 라이브러리를 제작하고 기 결정된 프라이머를 이용하여 목적 유전자의 cDNA를 확보하였다. 확보되어진 cDNA를 에스케리키아 콜라이내로 형질전환하기 위한 재조합 벡터를 조립하였고 조립된 재조합 벡터를 에스케리키아 콜라이에 형질전환하고 형질전환체로부터 삽입된 유전자를 결정하였다. 삽입된

유전자의 단백질 발현을 위하여 IPTG로 발현을 유도한 후 SDS-PAGE를 이용하여 단백질 발현을 확인하였다. 대조군에 비하여 단백질의 특이적 발현이 확인된 에스케리키아 콜라이에 대하여 감마부티로베타인을 기질로하여 L-카르니틴이 생산되는 것을 확인하였다(표 1).

<17> 본 발명은, 상기한 바와 같이 확인된, 본 발명 이전까지 밝혀진 바 없었던 뉴로스포라 크라사 기원의 새로운 감마부티로베타인 하이드록실라제의 유전자 서열을 확인한 것에 기초하고 있으며, 본 발명자들에 의해 새로이 밝혀진 뉴로스포라 크라사 기원의 감마부티로베타인 하이드록실라제의 폴리뉴클레오타이드 서열을 서열번호 1로 나타내었다.

<18> 본 발명은 상기한 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드 서열을 갖는 유전자를 포함하여 발현되는 경우 감마부티로베타인 하이드록실라제 활성을 갖는 폴리펩타이드를 코딩하는 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 단편, 유도체 등의 변이체도 본 발명의 범위에 포함된다.

<19> 추가의 양태로서, 본 발명은 상기한 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드와 70% 이상의 상동성을 갖고 감마부티로베타인 하이드록실라제 활성을 가지는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

<20> 본 발명에서 폴리뉴클레오타이드 유전자 또는 이러한 폴리뉴클레오타이드 유전자에 의해 코딩되는 단백질 또는 폴리펩타이드에 대해 사용된 용어 "상동성"이란 야생형(wild type) 아미노산 서열 및 야생형 핵산 서열과의 유사한 정도를 나타내

기 위한 것으로서, 단백질의 경우 본 발명의 감마부티로베타인 하이드록실라제 단백질의 아미노산 서열과 75%이상, 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상 동일할 수 있는 아미노산 서열을 포함한다. 일반적으로, 단백질 상동물은 목적 단백질과 동일한 활성 부위를 포함할 것이다. 유전자의 경우 본 발명의 감마부티로베타인 하이드록실라제 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열과 75%이상, 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90%이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상 동일할 수 있는 유전자 서열을 포함한다. 이러한 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행한다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다. 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

<21>            추가의 바람직한 양태로서, 본 발명은 서열번호 1의 서열과 75%, 바람직하게는 85%, 보다 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖고 감마부티로베타인 하이드록실라제 활성을 가지는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

<22>            또 다른 양태로서, 본 발명은 서열번호 2에 기재된 감마부티로베타인 하이드록실라제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

<23>            본 발명에 따라 상기한 뉴로스포라 크라사 기원의 감마부티로베타인 하이드록실라제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 유전자를 벡터에 삽입하여 이를 발현시킴으로써 감마부티로베타인 하이드록실라제를 다량으로 확보할 수 있다.

- <24> 따라서, 또 다른 양태로서, 본 발명은 뉴로스포라 크라사 기원의 감마부티로 베타인 하이드록실라제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- <25> 본 발명에서 "벡터"는 적당한 숙주 세포에서 단백질의 발현을 조절할 수 있는 조절 서열(regulatory sequences)에 작동 가능하도록 연결된 DNA 서열 및 기타 유전자 조작을 용이하게 하거나 단백질의 발현을 최적화하기 위해 도입되는 서열들을 함유하는 DNA 작제물을 말한다. 그러한 조절 서열에는 전사를 조절하기 위한 프로모터(promoter), 전사를 조절하기 위해 선택적으로 부가된 오퍼레이터(operator), 적절한 mRNA 리보솜 결합 부위 및 전사/번역의 종료를 조절하는 서열들이 포함된다. 외래 유전자를 삽입하기 위한 벡터로는 플라스미드, 바이러스, 코즈미드 등 다양한 형태의 벡터를 사용할 수 있다.
- <26> 벡터는 클로닝 벡터 및 발현 벡터를 포함하며, 클로닝 벡터는 외래 DNA가 삽입되어 복제될 수 있는 플라스미드로서, 형질전환 시 숙주 박테리아 세포로 외래의 DNA를 전달시킨다. 발현 벡터는 통상 외래 DNA의 단편이 삽입된 캐리어로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 외래 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이중 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포 내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 삽입된 외래 DNA가 생성될 수 있다. 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주 세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동 가능하도록 연결되어야만 한다.

- <27> 본 발명에 따라 제작된 뉴로스포라 크라샤 기원의 감마부티로베타인 하이드록실라제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키기 위한 벡터 pT7-BBH2(*Eshcherichia coli* DH5 α CJ2004)는 2004년 01월 27일자로 기탁기관 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganism :KCCM)에 기탁번호 KCCM-10557로 기탁되었다.
- <28> 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질 전환된 형질전환체를 제공한다.
- <29> 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 형질전환에 사용될 수 있는 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포 모두를 포함할 수 있다. DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 세균, 예를 들어 에스케리키아, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균, 효모와 같은 주지의 진핵 및 원핵 숙주들, 스포도프테라 프루기페르다(SF9)와 같은 곤충 세포, CHO, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40, BMT 10 등의 동물 세포 등이 사용될 수 있는 숙주 세포의 예이다. 바람직하게는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)가 사용될 수 있다.
- <30> 상기한 바와 같은 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 서열번호 2에 나타내었으며, 하나의 양태로서 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 뉴로스포라 크라샤 기원의 감마부티로베타인 하이드록실라제



를 제공한다.

<31>           또 다른 양태로서 본 발명은 서열번호 2의 서열과 75%, 바람직하게는 85%, 보다 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖고 감마 부티로 베타인 하이드록실라제 활성을 가지는 변이체로 이루어진 그룹중에서 선택되는, 감마 부티로베타인 하이드록실라제를 제공한다.

<32>           본 발명에 따른 감마부티로베타인 하이드록실라제를 도 5에 나타난 바와 같이 감마부티로베타인을 L-카르니틴을 제공하는데 사용할 수 있으며, 이에 따라 광학적으로 순수한 L-카르니틴을 수득할 수 있다.

<33>           따라서, 또 다른 양태로서 본 발명은 감마부티로베타인을 상기한 바와 같은 감마부티로베타인 하이드록실라제로 하이드록실화하여, L-카르니틴을 제조하는 방법을 제공한다.

<34>           상기한 바와 같이 수득된 L-카르니틴은 카르니틴 결핍 및 기타의 치료학적 요법에 사용하여 L-카르니틴의 보충에 사용될 수 있다.

<35>           이하 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

<36> <실시예 1> 뉴로스포라 크라사 cDNA 라이브러리 제작

<37> 뉴로스포라 크라사의 cDNA를 획득하기 위하여 뉴로스포라 크라사로부터 먼저 mRNA를 분리하여 폴리티(polyT) 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction: PCR)을 수행하여 cDNA를 제작하였다. cDNA는 AD5 클로닝벡터(cloning vector)에 EcoRI, XhoI 으로 삽입되어 있으며 플라스미드화된 cDNA 풀(pool)을 획득하기 위해서 다음과 같은 과정을 수행하였다: *에스케리키아 콜라이* BNN322 균주를 LB km (kanamycin) + 0.2% 말토즈 에서 밤새 배양하여, 원심 분리를 이용하여 균주 세포를 수거한 후에 1 ml 의 10 mM-MgSO<sub>4</sub> 용액에 혼탁하였다. 이 균주들을 cDNA 풀을 보유한  $3.5 \times 10^7$   $\lambda$  와 함께 30℃ 에서 30 분 동안 분탕 없이 배양하였다. 2 ml의 LB배지를 추가하여, 감염된 균주를 30℃ 에서 1 시간 동안 진탕 배양하였다. 이를 LB + 암피실린 (75 $\mu$ l/ml) 배지에 도말하였다. 생성된 콜로니들로부터 플라스미드를 분리하여 cDNA 라이브러리 풀을 만들었다.

<38> <실시예 2> 감마부티로베타인 하이드록실라제의 유전자 획득을 위한 프라이머 제작

<39> 뉴로스포라 유래의 감마부티로베타인 하이드록실라제와 인간, 래트 및 슈도모나즈로부터의 감마부티로베타인 하이드록실라제의 아미노산 서열을 비교하였다

(도 3). Sequence 1을 뉴로스포라 크라사, Sequence 2를 사람, Sequence 3을 래트, Sequence 4를 슈도모나즈라로부터의 서열이라 하였을 때 다음과 같은 서열 상동성을 나타내었다 (Start of Pairwise alignments):

<40> Sequences (1:2) Aligned. Score: 11%

<41> Sequences (1:3) Aligned. Score: 11%

<42> Sequences (1:4) Aligned. Score: 10%

<43> Sequences (2:3) Aligned. Score: 88%

<44> Sequences (2:4) Aligned. Score: 29%

<45> Sequences (3:4) Aligned. Score: 29%

<46> 이와 같이 뉴로스포라 크라사의 감마부티로베타인 하이드록실라제는 사람의 감마부티로베타인 하이드록시라제와는 11%의 상동성을 나타내었다.

<47> 상기한 바와 같이 뉴로스포라 크라사의 유전체 정보를 탐색하여 감마부티로 베타인 하이드록실라제의 클로닝을 위한 프라이머를 다음과 같이 제작하였다.

<48> 프라이머 1:

<49> 5' ATG AAT TCC ATA TGA TGG CCA CGG CAG CGG TTC AG 3' (서열번호 3)

<50> 프라이머 2:

<51> 5' ATT AGT CGA CTC AAT ACC CTC CCC CAC CCT G 3' (서열번호 4)

<52> <실시예 3> 감마부티로베타인 하이드록실라제의 암호화 유전자 획득

<53> 실시예 1로부터 획득한 뉴로스포라 크라사의 cDNA 라이브러리로부터 실시예 2에서 제작된 프라이머를 이용하여 폴리머라제연쇄증합반응(PCR)에 의해 감마부티로베타인 하이드록실라제의 유전자를 증폭하였으며 아가로즈 전기영동 결과 약 1.4 kbp 에서 밴드를 확인하였고, 자동 염기서열분석을 통하여 유전자의 염기서열을 확인하였다. 또한, 분석된 염기서열을 NCBI BLAST 의 검색엔진을 이용하여 염기서열상의 유사한 정보를 검색한 결과, 뉴로스포라 게놈 서열에서 100% 동일한 유전자가 검색되었고, 그 유전자의 기능예측은 가설적 단백질(hypothetical protein)로만 명명된 상태임을 확인하였다. 효소연쇄증합반응 산물을 *Eco*RI 과 *Sal* I 으로 절단하여 같은 효소들로 절단한 pUC19 에 결합하여 *에스케리키아 콜라이* DH5로 형질전환하였으며, 블루/화이트 검정에 의해서 분리된 형질전환체로부터 감마부티로베타인 하이드록실라제의 유전자가 삽입된 플라스미드를 확인하였다.

<54> <실시예 4> 플라스미드 pT7-BBH2의 조립

<55> 확보한 감마부티로베타인 하이드록실라제의 유전자가 함유된 플라스미드로부터 *Nde* I 과 *Sal* I 제한효소를 이용하여 절단한 후에 저융점 아가로즈 겔에 전기영동하여 감마부티로베타인 하이드록실라제 유전자 DNA만을 분리정제한 후에 *Nde* I

및 *Sal* I으로 처리된 pT7-7에 삽입하였다(도 4). 결합 혼합물을 *에스케리키아 콜라이* DH5 균주로 형질전환한 후에 암피실린(ampicillin)이 함유된 고체평판배지에서 형질전환체를 분리하였다. 분리된 형질전환체로부터 재조합 플라스미드를 분리하여 *Nde* I 및 *Sal* I으로 절단하여 감마부티로베타인 하이드록실라제의 유전자의 삽입을 확인하였고 이를 pT7-BBH2로 명명하였다. 이러한 재조합 플라스미드를 *에스케리키아 콜라이* DH5 α에 도입하고 기탁명 *에스케리키아 콜라이* DH5 α CJ2004로 하여 2004년 01월 27일자로 한국미생물보존센터 (Korean Culture Center of Microorgaism :KCCM)에 기탁번호 KCCM-10557로 기탁하였다.

<56> <실시에 5> 플라스미드 pT7-BBH2의 발현 균주 *에스케리키아 콜라이*/BL21(DE 3)로의 형질전환

<57> 암피실린 선택 마커를 가지고 있는 pT7-BBH2 플라스미드를 발현균주 *에스케리키아 콜라이* BL21(DE3)로 형질전환하였다. *에스케리키아 콜라이* BL21(DE3)은 젖당 혹은 IPTG에 의해서 T7 RNA 폴리머라제를 생산하는 균주로서, 이 때 생산된 T7 폴리머라제에 의해서 감마부티로베타인 하이드록실라제 유전자의 전사가 유발된다. 암피실린이 함유된 고체 평판배지에 도말하여 선별된 형질전환체로부터 플라스미드를 정제하여 *Nde* I 과 *Sal* I 제한효소로 절단하여 삽입된 유전자와 플라스미드의 크기 확인을 통하여 조립된 pT7-BBH2 플라스미드가 도입되었음을 확인하였다.

<58> <실시예 6> 감마부티로베타인 하이드록실라제의 발현

<59> 감마부티로베타인 하이드록실라제의 발현을 확인하기 위하여 *에스케리키아 콜라이* BL21(DE3)에 pT7-BBH2 가 형질전환된 형질전환체 BL21(DE3)/ pT7-BBH2를 배양하였다. 50ml의 LB 또는 암피실린이 첨가된 LB 배지가 담긴 250ml 배플이 장착된 플라스크에서 OD600 0.6까지 배양한 후 1mM의 IPTG를 넣고 4시간을 더 배양하였다. 4,000 xg에서 15 분간 원심분리하여 균주를 수거하고, 1ml의 용해 용액(10mM 인산나트륨 완충액 pH7.4에 140mM NaCl, 200g/liter 글리세롤, 및 1mM DTT)으로 재혼탁하였다. 세포를 얼음 속에 잠기게 한 후에 초음파 분쇄기를 이용하여 10초씩 5번 반복하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄 후에 4℃, 10,000 x g에서 20 내지 30분 정도 원심분리 하여 세포 지꺼기는 제거하고 상층액만 모았다. SDS-PAGE를 수행하여 약 49 kDa의 감마부티로베타인 하이드록실라제를 확인하였다. 필요 시에는 브래드포드(Bradford) 용액을 이용하여 단백질량을 측정하였다.

<60> <실시예 7> L-카르니틴 분석방법

<61> 뉴로스포라 크라사의 조추출물을 500ul 검정 혼합물 (20mM 인산칼륨 완충액 pH7.0에 20mM KCl, 3mM -케토글루타레이트, 10mM 아스코르브산나트륨, 2g/liter

Triton X-100, 0.25mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 및 0.2mM -부티로베타인)에 넣은 후, 37℃에서 1시간 동안 처리하였다. 500 $\mu$ l의 상등액을 취하여 1.2M의 과염소산500 $\mu$ l와 섞었다. 혼합한 용액을 실온에서 10분간 배양 후, 5분간 원심분리하였다. 상등액 600 $\mu$ l와 0.7M의 K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 320 $\mu$ l와 혼합하고, 빙욕에서 20분간 방치하였다. 혼합액을 5분간 원심분리하고, 750 $\mu$ l의 상등액을 채취해서 250 $\mu$ l의 멸균증류수와 혼합하여 희석시켰다. 이 용액에 100 $\mu$ l의 DNTB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣고 실온에서 10분간 방치하였다. 50 $\mu$ l의 카탈라제 용액을 넣고 30분간 실온에서 대기한 후에 원심분리하고 상등액 1ml을 수거하였다. 1ml에 50 $\mu$ l의 아세틸CoA를 넣고 실온에서 5분간 방치하였다. 2.26 $\mu$ l의 카르니틴 아세틸 트랜스퍼라제를 넣고 상온에서 10분간 방치하였다. 405nm에서 흡광도를 측정한 후에 L-카르니틴의 양을 계산하였다.

<62> <실시예 8> 발현된 감마부티로베타인 하이드록실라제의 유전자를 감마부티로베타인을 기질로 한 L-카르니틴 생성능 확인

<63> 실시예 5에서 조립된 감마부티로베타인 하이드록실라제 유전자로 형질전환된 대장균을 50ml의 LB 또는 앰피실린이 첨가된 LB 배지가 담긴 250ml 배플이 장착된 플라스크에서 OD<sub>600</sub> 0.6까지 배양한 후 1mM의 IPTG를 넣고, 정확한 효소의 3차구조 형성을 이루면서 봉입체(inclusion body)의 형성을 방지하기 위하여 25℃에서 8시간 이상 배양하였다. 4,000(xg)에서 15 분간 원심분리하여 발현 균주를 수거하고.

단백질의 조추출물을 실시예 6의 방법으로 얻었다. 단백질 1.0mg/ml을 함유하는 조추출물 및 감마부티로베타인 0.5mg/ml을 포함하는 반응액을 4시간 반응시킨 후에 실시예 7의 방법으로 L-카르니틴의 함량을 하기 표 1과 같이 확인하였다.

【표 1】

&lt;64&gt;

검정 산물	L-카르니틴 농도(ug/ml)
x-BBH 검정 혼합물 + 1.0 mg/ml BL21(DE3) 조추출물	0.0
y-BBH 검정 혼합물 + 1.0mg/ml BL21(DE3)/pT7-BBH2 (IPTG에 의해 유도됨) 조추출물	0.8

## 【발명의 효과】

&lt;65&gt;

본 발명에 따라 뉴로스포라 크라사 기원의 감마부티로베타인 하이드록실라제를 암호화하는 신규 유전자를 밝혀냄으로써 감마부티로베타인으로부터 광학적으로 순수한L-카르니틴을 생산하는데 이용할 수 있다.



**【특허청구범위】****【청구항 1】**

서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오타이드 또는 서열번호 2에 기재된 감마부티로베타인 하이드록실라제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 중에서 선택되는 유전자.

**【청구항 2】**

제1항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

**【청구항 3】**

제2항에 있어서, 기탁번호 KCCM-10557의 재조합 벡터.

**【청구항 4】**

제1항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

**【청구항 5】**

제4항에 있어서, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)인 형질전환체.

**【청구항 6】**

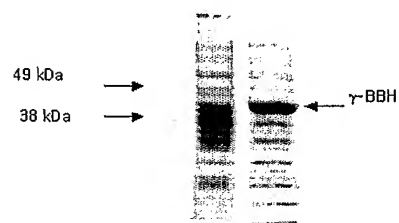
서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열 중에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는 감마부티로베타인 하이드록실라제.

**【청구항 7】**

감마부티로베타인을 제6항의 감마부티로베타인 하이드록실라제로  
하이드록실화하여, L-카르니틴을 제조하는 방법

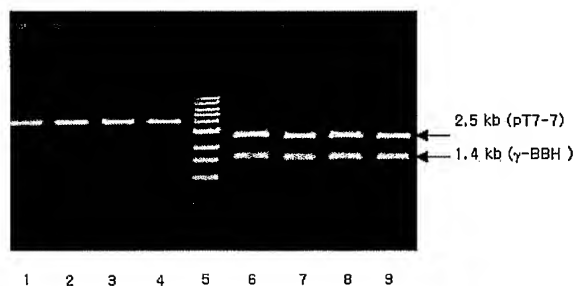
## 【도면】

【도 1】



Lane 1 : Protein molecular size marker,  
 Lane 2 : E.coli BL21 w/o  $\gamma$ -BBH gene,  
 Lane 3 : E.coli BL21 w/  $\gamma$ -BBH gene and induced by 1mM IPTG

【도 2】



Lane 1~4 : pT7-7 +  $\gamma$ -BBH plasmid digested with Nde I  
 Lane 5: 1kb DNA ladder  
 Lane 6~9 : pT7-7 +  $\gamma$ -BBH plasmid digested with Nde I and Sal I

## 【도 3】

## CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

Human      -----MACTIQKAEALDGAHLMQILWYDEEESLPAYWLRDNCPCSDCYLDSAKARK 52
rat        -----MHCAILKAEAYDGAHLMQIFWHDGAESLPAYWLRDNCQCSDCYLHSAKARK 52
pseudomonas NAIA DVRTFPLISPLASAA SFASGVSYT WADGRVSPFHNWLRDNCPCGDCVYEVTRQV 60
N.crassa   -----MATAAVQVSVPAVPVGGQPDIGYAPDHDKVYLARVKRRRENEKLESSLPPG----- 48
          : . . . . . : : : : : : * : : .

Human      LLVEALDVNIGIKGLIFDRK-KVYITWPDEHYSEFQADWLKKRCFSKQARAKLQRELFFP 111
rat        LLLEALDVNIRMDDLTFDQK-KVYITWPNGHYSEFEANWLKKRCFSQEARAGLQGLFLP 111
pseudomonas FLVADVPEIIVQQA VTI GDDGRLVVGWDDGHASAYHPGWLRAHAYDAQSLA--EREAA RP 118
N.crassa   -FPRRLDSDLVWDGNTLAETVDTYRLTEEAIDEIEAALRHFKSLNKPLGVINQETFPPLP 107
          : : : : : : : : : : : : : : : *

Human      ECQYWGSELQLPTLDFEDVLRVDEHAYKWLSTLKKVGI VRLTGASDKPGEVSKLGKRMGF 171
rat        ECQYWGSELQLPTLNFEDVLRNDDHAYKWLSSLKKVGI VRLTGAADKRGELIKLGKRI GF 171
pseudomonas HKHHRWQGLSLPYVDHGAVMQDDDTLLEWLLAYRVDVGLTQLHGVPTEPGAL I PLAKRISF 178
N.crassa   RLHHTLRSLSHLHHGHGFKVLR--GLPVTSHTRENI I IYAGVSSHVAPI RGRQDNQ-H 164
          : : : * : : : : : : : : : * . . . . .

Human      LYLTFVGHTWQVQDKIDANNVAYTTGKLSFHTDVPALHHPPG-VQLLHCI KQTVTGGDSE 230
rat        LYLTFVGHTWQVQDKIDANNVAYTTGKLSFHTDVPALHHPPG-VQLLHCI KQTVTGGDSE 230
pseudomonas IRESNFGVLFVRSKADADSNAVTA FNLP LHTDLPTRQLQPG-LQFLHCLVNDATGGNST 237
N.crassa   NGHPADVVLAHI KDLSTTVSDVSKI GAPAYTTEKQVFHTDAGDI VALFCLGEAAEGGQSV 224
          : : : : : : : : : * : : : : * : : : : * : : :

Human      IVDGFNVQCQLKKNPQAFQILSS--TFVDFTDIGV-----DYCDFSVQSKHKI I ELDDK 283
rat        IVDGFNVQCQLKEKNPQAFSILSS--TFVDFTDIGV-----DYCDFSVQSKHKI I ELDDK 283
pseudomonas FVDGFAIAEALRIEAPAAVRLCE--TPVEFRNK-----DRAHSDVACTAPVIALDSS 287
N.crassa   LSSSWKVYNELAAATRPDLVRTLAEPWVADEFGKEGRKFSVRPLLHFQSTAAAA SREAKPE 284
          : : : : : * : : : : * : : : : : : : : : . . . . .

Human      GQVYRI NFNNATRDITFDVP-VERVQPFYAALKEFVDLMN--SKESKFTFKMNP GDVITF 340
rat        GQVYRI NFNNATRDITFDVP-IERVQPFYAALKEFVDLMN--SKEYKYTFKMNP GDVITF 340
pseudomonas GEVREIRLANFLR-APFQMD-AQRMPDYVLAVRRFI QMTR--EPRFCFTARLEAGQLWCF 343
N.crassa   SERLI IQYARRTFTGVWGLPRADIPPI TEAQAEALDALHFTA EKYAVALDFRQGDVQFV 344
          : : * : : : : : : : : : : * : : : : : : : : : : : : :

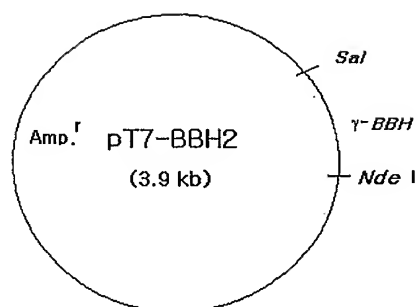
Human      DNWRLLHGRRSYEAGTEISRHLEGAYAD-----WDVYMS-----ALRIL 379
rat        DNWRLLHGRRSYEAGTEISRHLEGAYAD-----WDVYMS-----ALRIL 379
pseudomonas DNRRVLRHARDAFDP-ASGDRHFQGCYVD-----RDELLS-----RILVL 381
N.crassa   NNLSVFHSRAGFRDEGEKQRLHVLRLWLRDPENAWETPEALKERWERVYGGVSPEREVFPL 404
          : * : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

Human      RQRVENGN----- 387
rat        RQRVMNGN----- 387
pseudomonas QR----- 383
N.crassa   EPQIRASASKGESVGTGGGGV 425

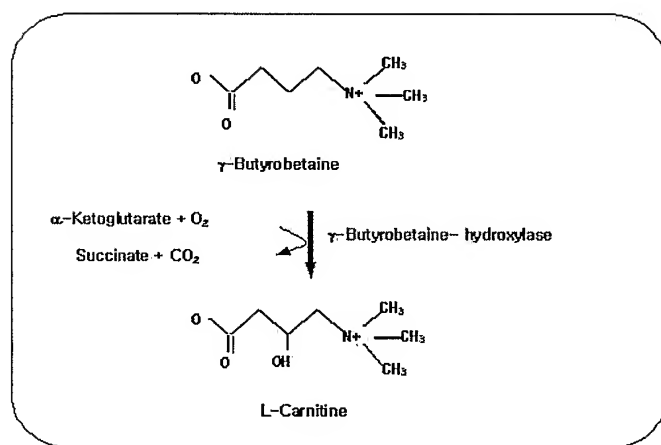
```

(Sequences were aligned using the European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) sequence analysis program, clustalW.)

【도 4】



【도 5】



[illegible]

```

<110>      CJ Corp.
<120>      gamma-Butyrobetaine hydroxylase originated from Neurospora crassa
<160>      4
<170>      KopatentIn 1.71
<210>      1
<211>      1346
<212>      DNA
<213>      Neurospora crassa
<400>      1

```

31-28

gaaatcgagg ccgcgcttcg tcattttaag agttagtaca gaatctctcc ttcctgtcct 300  
 tgggcatcaa gccatcaact aaccatcacc gcatgacagg cctcaacaag cccctaggct 360  
 acatcaacca agaaaccttc ccccttcccc gcctacacca cactctccgc tccctctccc 420  
 acgagctcca ccacggccac ggcttcaaag tcctccgcgg gctccccgtc acctcccata 480  
 cacgcgagga aaacatcatc atctacccg gcgtctcctc gcatgtcgct cctatccgcg 540  
 gccgccagga caaccagcac aacggccacc cagccgacgt agtcctagca cacatcaaag 600  
 acctgtccac gactgtttct gacgtgagca aaatcgggtc acccgctac accaccgaga 660  
 aacaagtctt ccacaccgac gcaggcgaca tcgtcgccct cttttgcttg ggagaggccg 720  
 ccgagggcgg acagagttac ctgtccagca gctggaaggt gtacaacgag ctggcagcca 780  
 ctcgccccga tctggttcgc acgctggcgg agccgtgggt ggccggacgag ttggcaagg 840  
 aagggaggaa gttttctgtg cgaccgcttt tgcattttca gtctactgct gctgctgctt 900  
 ctagggaagc aaagcccag tctgaacggc tcatcatcca gtacgccgc cgcacgttta 960  
 cggggtattg gggattaccg aggtcgccgg atatccgcc cattacggag gcgcaggcgg 1020  
 aggcgttga tgcgtgcac ttacggcgg agaagtacgc ggtggcgctg gatttcaggc 1080  
 agggggatgt ccagtttgtg aataactga gtgtgttcca ttcgagggcg gggtttagag 1140  
 atgaggggga gaagcagagg catittgtta ggttgtggtt gagagatccg gagaatgcgt 1200  
 gggagacgcc cgaggcggtg aaggaacggt gggaacgcgt gtatggcggg gtgagtccgg 1260  
 agagggaggt gtttccgctt gagccgcaga ttaggagcgc gagtaagggg gagagcgtgg 1320  
 ggacgcaggg tgggggaggg tattga 1346

<210> 2

<211> 425

<212> PRT

<213> Neurospora crassa

<400> 2

Met Ala Thr Ala Ala Val Gln Val Ser Val Pro Ala Pro Val Gly Gln

1 5 10 15 Pro Asp Ile Gly Tyr Ala Pro Asp His Asp Lys

Tyr Leu Ala Arg Val

20

25

30

Lys Arg Arg Arg Glu Asn Glu Lys Leu Glu Ser Ser Leu Pro Pro Gly

35

40

45

Phe Pro Arg Arg Leu Asp Ser Asp Leu Val Trp Asp Gly Asn Thr Leu

50

55

60

Ala Glu Thr Tyr Asp Trp Thr Tyr Arg Leu Thr Glu Glu Ala Ile Asp

65

70

75

80

Glu Ile Glu Ala Ala Leu Arg His Phe Lys Ser Leu Asn Lys Pro Leu

85

90

95

Gly Tyr Ile Asn Gln Glu Thr Phe Pro Leu Pro Arg Leu His His Thr

100	105	110
Leu Arg Ser Leu Ser His Glu	Leu His His Gly His Gly Phe Lys Val	
115	120	125
Leu Arg Gly Leu Pro Val Thr Ser His Thr Arg Glu Glu Asn Ile Ile		
130	135	140
Ile Tyr Ala Gly Val Ser Ser His Val Ala Pro Ile Arg Gly Arg Gln		
145	150	155
160		
Asp Asn Gln His Asn Gly His Pro Ala Asp Val Val Leu Ala His Ile		
165	170	175
Lys Asp Leu Ser Thr Thr Val Ser Asp Val Ser Lys Ile Gly Ala Pro		
180	185	190
Ala Tyr Thr Thr Glu Lys Gln Val Phe His Thr Asp Ala Gly Asp Ile		
195	200	205
Val Ala Leu Phe Cys Leu Gly Glu Ala Ala Glu Gly Gly Gln Ser Tyr		
210	215	220
Leu Ser Ser Ser Trp Lys Val Tyr Asn Glu Leu Ala Ala Thr Arg Pro		
225	230	235
240		
Asp Leu Val Arg Thr Leu Ala Glu Pro Trp Val Ala Asp Glu Phe Gly		
245	250	255
Lys Glu Gly Arg Lys Phe Ser Val Arg Pro Leu Leu His Phe Gln Ser		
260	265	270
Thr Ala Ala Ala Ala Ser Arg Glu Ala Lys Pro Glu Ser Glu Arg Leu		
275	280	285
Ile Ile Gln Tyr Ala Arg Arg Thr Phe Thr Gly Tyr Trp Gly Leu Pro		
290	295	300
Arg Ser Ala Asp Ile Pro Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ala Glu Ala Leu		
305	310	315
320		
Asp Ala Leu His Phe Thr Ala Glu Lys Tyr Ala Val Ala Leu Asp Phe		
325	330	335
Arg Gln Gly Asp Val Gln Phe Val Asn Asn Leu Ser Val Phe His Ser		
340	345	350
Arg Ala Gly Phe Arg Asp Glu Gly Glu Lys Gln Arg His Leu Val Arg		
355	360	365
Leu Trp Leu Arg Asp Pro Glu Asn Ala Trp Glu Thr Pro Glu Ala Leu		
370	375	380
Lys Glu Arg Trp Glu Arg Val Tyr Gly Gly Val Ser Pro Glu Arg Glu		
385	390	395
400		



Val Phe Pro Leu Glu Pro Gln Ile Arg Ser Ala Ser Lys Gly Glu Ser

405

410

415

Val Gly Thr Gln Gly Gly Gly Tyr

420

425

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for amplifying the gene of gamma-Butyrobetaine hydroxylase  
originated from Neurospora crass

<400> 3

atgaattcca tatgatggcc acggcagcgg ttcag

35

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for amplifying the gene of gamma-Butyrobetaine hydroxylase  
originated from Neurospora crass

<400> 4

attagtcgac tcaataccct cccccaccct g

31

